

## Сравнительная характеристика молекулярно-биологической эффективности криопротекторов при криоконсервировании костного мозга

В.И. Ващенко<sup>1</sup>, А.В. Чечеткин<sup>1</sup>, Т.Н. Ващенко<sup>1</sup>, Т.К. Борисова<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Военно-медицинская академия, г.Санкт-Петербург

<sup>2</sup>НИИ вирусных препаратов РАМН

Одной из основных проблем криобиологии и криомедицины является сохранение живых систем от повреждающего действия холода. Методы глубокого охлаждения биологического материала приобрели особую важность для создания запасов и длительного хранения в жизнеспособном состоянии костного мозга как необходимого этапа трансплантации аутологичного (аТКМ) и донорского костного мозга, требуемого при лечении больных острыми и хроническими лейкозами, миеломной болезнью, лимфомами и другими неопластическими заболеваниями. Кроме того, наличие банков аутологичного костного мозга важна также для лиц, профессиональная деятельность которых связана с повышенным риском при выполнении воинского долга и для работников предприятий повышенной опасности [1]. Среди различных способов длительного хранения органов и тканей наиболее надежным и разработанным является метод криоконсервирования при сверхнизких температурах. Учеными различных специальностей интенсивно изучается структурно-функциональное состояние органов и тканей криоконсервированных под защитой различных криофилактиков [2, 3]. Как обособленный раздел теории восстановления функций живых объектов после криоконсервирования можно принять гипотезу о стимулирующем действии сверхнизких температур на процессы репарации внутриклеточных дефектов и дифференцировки клеточных популяций после криоконсервирования [4, 5].

Однако до настоящего времени имеется немного сведений о связи изменений изоферментного состава ЛДГ в клетках костного мозга и конформационной стабильности ДНК при применении разных криофилактиков. Поэтому, основной задачей нашей работы было изучение различий в криозащитной эффективности криопротекторов по особенностям внутриклеточных изменений конформации сверхспиральной ДНК (ссДНК) клеток костного мозга и активности отдельных ферментов энергетического цикла на разных этапах криоконсервирования.

*Адрес для корреспонденции:* Ващенко В.И., ВмедА НИО крови и ткани, г.Санкт-Петербург, Загородный 47, телю: +7 (082) 259-52-71; e-mail: blood@infos.ru

### Материалы и методы

В работе использовался донорский и аутологичный костный мозг, заготовленный общепринятыми методами [6]. Регистрацию изоферментного состава ЛДГ проводили при помощи аппарата SUPER CELLO-5 (HOSPITEX, Швейцария) на ацетатцеллюлозных пленках. Оценку структурных нарушений ссДНК клеток костного мозга, криоконсервированного под защитой криофилактиков ПВП, ПЭО-400, ДМАЦ и ДМСО осуществляли по описанным методам [7, 8].

### Результаты и обсуждение

При экстремальных ситуациях (воздействие сверхнизких температур) важно знать чувствительность клеток костного мозга к непосредственному действию физико-химических факторов на разных этапах криоконсервирования, которые могут изменять криоустойчивость этих клеток и оказывать влияние на сохранность их функциональной активности, в частности, на скорость и согласованность биохимических процессов. В табл. 1 приведены результаты исследования изоферментного состава ЛДГ при обработке клеток донорского костного мозга криофилактиками ПВП и ПЭО-400.

Представленные данные показывают, что обработка костного мозга криофилактиками приводит к существенным изменениям энергетики клеток. На фоне понижения общей активности ЛДГ (причем ПЭО-400 снижает ее почти в 3 раза, а ПВП в 2 ( $p < 0,01$ )) происходит перераспределение состава ее изоферментов. После введения криофилактиков перед замораживанием существенно возрастает относительное количество М-форм ЛДГ с соответствующим уменьшением Н-фракций ЛДГ, т.е. активность энергозависимых обменных процессов снижается. Затем после размораживания и отмывания от криопротекторов состав изоферментов восстанавливается и практически не отличается от содержания изоферментов в нативном костном мозге. Можно предположить, что уменьшение суммарной активности обусловлено отмыванием части разрушенных клеток, содержащих основную часть активности ЛДГ. Однако такое утверждение справедливо лишь отчасти, так как в супернатанте

(табл. 2) спектр изоферментов был весьма близок к существующему в плазме доноров и отличался от имеющегося в клетках.

Таким образом, перераспределение в размороженных клетках изоферментов ЛДГ от М-форм (ЛДГ<sub>4</sub>, ЛДГ<sub>5</sub>) в сторону Н-форм (ЛДГ<sub>1</sub>, ЛДГ<sub>2</sub>) свидетельствует о быстром восстановлении их метаболизма и, прежде всего, энергетических обменных процессов. Следовательно, происходящие под действием сверхнизких температур изменения изоферментного спектра ЛДГ являются отражением внутриклеточной перестройки обменных процессов. Эти биохимические изменения во-первых, согласуются со значительным уменьшением содержания АТФ в оттаянных после криоконсервирования клетках; причем, при использовании ПЭО-400 в 1,5, а ПВП в 1,8 раза соответственно. Во-вторых, выход продукта реакции гликолиза ПВК значительно больше во взвеси размороженных клеток. В-третьих, сохранность клеток костного мозга при криоконсервировании с криопротектором ПВП была значительно выше, чем при использовании криофиликта ПЭО-400 (с ПВП около 85% и чуть больше 57% для ПЭО-400). В-четвертых, степень конформационных изменений ссДНК коррелировала ( $r=0,92$ ;  $p<0,01$ ) с изменением количества АТФ и ПВК во внеклеточной среде (табл. 3).

В настоящее время продемонстрировано, что после кратковременной инкубации клеточной суспензии аТКМ и последующего криоконсервирования в компоненте аТКМ полностью отсутствовала пролиферативная способность раковых клеток. При этом здоровые клетки аТКМ сохраняли свою функциональную полноценность без существенных изменений. В табл. 4 представлены результаты исследования изменений топологической структуры ссДНК и пролиферативной активности

**Таблица 1.** Изменение изоферментов ЛДГ (%) при использовании ПЭО-400 (n = 11)

Условия обработки костного мозга	Исследуемые показатели					
	ЛДГ <sub>1</sub>	ЛДГ <sub>2</sub>	ЛДГ <sub>3</sub>	ЛДГ <sub>4</sub>	ЛДГ <sub>5</sub>	ЛДГ <sub>общ</sub>
Нативный	35,0±4,5	33,1±2,0	14,2±4,6	8,6±2,6	9,1±3,8	9,5±0,5
После смешивания с ЦОЛИПК-3	45,8±5,2	28,8±5,4	14,7±4,5	7,3±2,2	2,9±0,6	7,9±0,6
После смешивания с ПЭО-400	11,0±3,7**	15,5±5,6**	16,7±5,8	19,0±4,3**	37,9±5,2**	3,4±0,8**
После оттаивания с ПЭО-400	42,5±6,6**	42,1±4,0**	7,8±2,5**	4,2±1,2	3,4±1,2**	2,2±1,1**
После смешивания с ПВП	12,2±1,4**	16,0±3,3**	15,3±1,4	21,8±1,8**	34,7±0,7**	5,2±1,3**
После оттаивания с ПВП	27,4±4,8**	31,0±2,3**	16,1±1,8	10,3±2,6**	15,2±3,2**	2,9±2,6**

**Примечание:** содержание изоферментов ЛДГ в %; суммарная активность ЛДГ<sub>общ</sub> – в мМ (ч / л); \* – различия значимы в сравнении с нативным костным мозгом ( $p<0,05$ ); \*\* – ( $p<0,01$ ).

**Таблица 2.** Изменение изоферментов ЛДГ в супернатанте при использовании ПВП и ПЭО-400 (n = 12)

Условия обработки супернатанта костного мозга	Исследуемые показатели					
	ЛДГ <sub>1</sub>	ЛДГ <sub>2</sub>	ЛДГ <sub>3</sub>	ЛДГ <sub>4</sub>	ЛДГ <sub>5</sub>	ЛДГ <sub>общ</sub>
Исходный	30,8±5,1	28,9±4,05	24,2±2,44	10,8±5,3	5,2±1,5	9,4±0,6
После смешивания с ЦОЛИПК	21,1±4,2	31,6±4,7	28,4±4,46	13,6±3,2	5,3±0,7	6,7±0,05*
После оттаивания с ПВП	19,2±6,5	26,5±3,1	27,2±4,4	15,3±4,1	11,9±4,1	3,9±0,08**
После оттаивания с ПЭО-400	29,7±5,8	26,0±2,2	17,0±2,1	13,1±2,5	14,1±3,1	3,7±0,07**

**Примечание:** ЛДГ<sub>общ</sub> – суммарная активность в мМ(ч/л); \* – различия значимы в сравнении с исходными образцами супернатанта костного мозга (до замораживания) ( $p<0,05$ ); \*\* – ( $p<0,01$ ).

**Таблица 3.** Динамика изменений содержания АТФ, ПВК и конформации ссДНК при использовании криопротекторов ПЭО-400, ПВП и ДМАЦ

Исследуемый показатель	Условия обработки клеток костного мозга: добавляемый раствор					
	нативный костный мозг (без добавления раствора)	ЦОЛИПК	Хенкса	ДМАЦ	ПЭО-400	ПВП
ИКН ссДНК $\eta/\eta_0$	1,00±0,02	1,14±0,03	1,24±0,02	1,33±0,03	1,47±0,03	1,62±0,04
Содержание АТФ (%)	100	–	–	65,3±4,7	66,7±4,0	52,9±5,0
Содержание ПВК(%)	100	–	–	274,5±22,0	308,6±21,5	400,2±22,6

**Примечание:** значения вязкости  $h/h_0$  ссДНК в таблице приведены в сравнении с измерениями в контроле при наличии в лизирующем растворе 3 мкг/мл ЭБ.

клеток аТКМ, криоконсервированного под защитой ДМАЦ и ДМСО.

Отметим, что при смешивании клеток аТКМ и донорского костного мозга с различными средами и криопротекторами их функциональное состояние изменяется сходным образом показатель ИКН ссДНК при использовании ДМАЦ и ДМСО в растворе Хенкса выше, чем в стандартном растворе ЦОЛИПК ( $p < 0,05$ ). Статистический анализ пока-

зал, что понижение уровня ИКН ссДНК после процедуры оттаивания коррелирует с уменьшением пролиферативной активности аутологичного костного мозга заготовленного для лечения больных с онкопролиферативными заболеваниями ( $r = 0,87$ ;  $p < 0,01$ ).

В работах, опубликованных ранее, мы уже отмечали, что для нормального функционирования топологической структуры ссДНК необходимо поддержать динамическое равновесие между уровнем и соотношением топоизомераз I и II типа как стабилизаторов топологической структуры ссДНК [9]. Поэтому возможно предположить, что изменение величины ИКН ссДНК связано с блокированием функционирования топоизомераз II класса. Их функции частично замещаются повышением активности топоизомераз I класса. Однако восстановить плотность сверхспирализации ссДНК топоизомеразы I типа не способны. Действительно в размороженном кадаверном костном мозге нами зарегистрировано отсутствие бифазности ссДНК при применении криофилактиков ПВП и ПЭО-400, но не ДМАЦ и ДМСО. Этот результат вполне согласуется с представлением о ДМСО как индукторе дифференцировки [10] и регистрируемой пролиферативной активностью клеток размороженного костного мозга [11-12]. Не исключено также, что при трансплантации размороженного костного мозга больным его пролиферативная активность восстанавливается как результат корректировки структурной активности топоизомеразы II. Работами сотрудников Отдела крови и тканей научно-исследовательского центра ВМедА доказано, что даже после 10 лет хранения криоконсервированного под защитой ДМАЦ кадаверного костного мозга в нем сохраняется значительная пролиферативная активность [1].

**Таблица 4.** Состояние пролиферативной активности аТКМ и структуры ссДНК при использовании ДМАЦ ( $n=21$ ) и ДМСО ( $n=7$ )

Условия обработки аТКМ	Исследуемые показатели					
	пролиферативная активность аТКМ в растворе ЦОЛИПК+ ДМАЦ		ИКН ссДНК нативного аТКМ, $\eta/\eta_0$			
	КОС единиц	КЛОС единиц	в растворе Хенкса	в растворе Хенкса + ДМАЦ	в растворе ЦОЛИПК + ДМАЦ	в растворе ЦОЛИПК + ДМСО
Исходный	41,0±4,0	82,0±5,5	1,25±0,02*	1,61±0,03*	1,37±0,03	1,57±0,03*
После смешивания с ЦОЛИПК	34,0±0,5	67,0±9,5**	—	—	1,21±0,02**	1,34±0,03***

**Примечания:** \* – различия значимы по сравнению с раствором Хенкса ( $p < 0,05$ ), \*\* – различия значимы по отношению к клеткам до криообработки ( $p < 0,02$ ), \*\*\* – ( $p < 0,01$ ).

В какой мере результаты изучения активности топоизомераз костного мозга согласуются с фактами, полученными при оценке состояния ссДНК и изоферментных спектров ЛДГ в этих же клетках до и после криоконсервирования под защитой криофилактиков ДМАЦ и ДМСО, необходимо еще исследовать.

## Выводы

1. При криоконсервировании аутологичного и донорского костного мозга под защитой криопротекторов ПВП, ПЭО-400, ДМАЦ и ДМСО изоферментный спектр ЛДГ в их клетках претерпевает значительные изменения. После оттаивания клеток костного мозга происходит конвертирование М-форм ЛДГ в Н-фракции ЛДГ в соотношении, наблюдаемом в нативном костном мозге.

2. При криоконсервировании костного мозга под защитой криопротекторов ПВП, ПЭО-400, ДМАЦ и ДМСО в клетках сохраняется топологическая структура ссДНК. В процессе подготовки к криоконсервированию и после оттаивания изменяется только показатель ИКН ссДНК, а ПСС (плотность сверхспирализации) остается неизменной.

## Литература

1. Багаутдинов Ш.М. Совершенствование методов долгосрочного хранения крови и костного мозга в замороженном состоянии в службе крови Вооруженных
2. Сил.: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – Л., 1998. – 37 с. Белоус А.М., Грищенко В.И. Кробиология. – Киев : Наук. думка, 1994. – 431 с.
3. Бабичук Г.А., Марченко В.С., Пастухов Ю.Ф. и др. К механизмам регуляции проницаемости гематоэнцефалического барьера охлажденного мозга. Сообщение 1. // Пробл. кробиологии. – 1995. – №1. – С.10-19.
4. Грищенко В.И., Обозная-Печенежская Э.И., Панков Е.Я. Обновление: биологических структур и функций с помощью низких температур и криоконсервирования –

- новое направление в биологии и медицине // Пробл. криобиологии.– 1995.– №4.– С. 3-10.
5. *Грищенко В.И., Алексеевская Э.И., Ващенко В.И. и др.* Криообновление костного мозга и апоптоз: гипотезы и реальность // Пробл. криобиологии.– 2001.– №3.– С.22-23.
  6. *Михайлов В.Г.* Консервация костного мозга.– М.: Медицина, 1979.– 144 с.
  7. *Ващенко Т.Н., Ващенко В.И., Петренко Г.И. и др.* Влияние криоконсервирования на топологические переходы суперспиральной ДНК “нуклеоидов” клеток костного мозга человека // Криобиология.– 1986.– №1.– С.34-38.
  8. *Ващенко В.И., Комар В.Е.* Оценка конформационных изменений суперспиральной ДНК эукариотических клеток методом прямой флуориметрии “нуклеоидов”. I. Сравнительная информативность различных методов изучения нарушений структуры суперспиральной ДНК в тимоцитах и макрофагах // Цитология.– 1986.– Т. 28, №7.– С. 750-754.
  9. *Ващенко В.И., Щедрина Л.В., Комар В.Е.* Топоизомераза II – ее роль в конформационных изменениях суперспиральной ядерной ДНК лимфоцитов после  $\gamma$ -облучения // Биополимеры и клетка.– 1985.– Т.1, №4.– С. 203-207.
  10. *Лучник А.Н.* Изменение сверхспирализации ДНК при дифференцировке, старении и злокачественной трансформации // Онтогенез.– 1983.– Т. 14, N3.– С. 227-237.
  11. *Грищенко В.И., Алексеевская Э.И.* Криообновление – основа для прогресса современных технологий в биологии и медицине // Успехи совр. биологии.– 2003.– Т. 123, №5.– С. 435-444.
  12. *Ващенко В.И., Четкин А.В., Ващенко Т.Н. и др.* Особенности изменений сверхспиральной ДНК и активности топоизомераз костного мозга человека, пригодного для миелотрансплантации // Цитология.– 2004.– Т. 46, №10.– С. 903.